

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 15/52, C12P 19/32, 19/18		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/09180
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05242		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. Februar 1999 (25.02.99)	
(22) Internationales Anmeldedatum: 18. August 1998 (18.08.98)		(81) Bestimmungsstaaten: DE, JP, <u>US</u> , europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 197 35 994.9 19. August 1997 (19.08.97) DE		Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PIEPERSBERG, Wolfgang [DE/DE]; Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal, Postfach 10 01 27, D-42097 Wuppertal (DE). DIETLER, Jürgen [DE/DE]; Düppeler Strasse 44, D-42107 Wuppertal (DE). ALBERMANN, Christoph [DE/DE]; Breite Strasse 109, D-42369 Wuppertal (DE).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).			

under exam.
09/455896

(54) Title: METHOD FOR ENZYMATICALLY PRODUCING GUANOSINE DIPHOSPHATE-6-DESOXYHEXOSES AND THE USE THEREOF FOR PRODUCING OLIGOSACCHARIDES

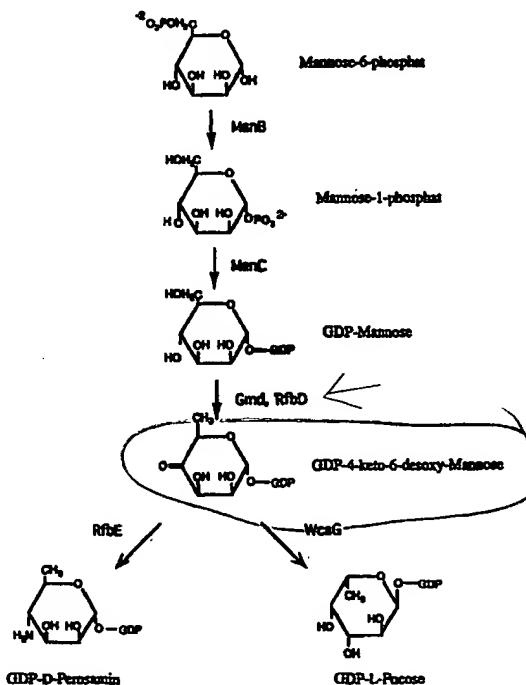
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ENZYMATISCHEN HERSTELLUNG VON GUANOSINDIPHOSPHAT-6-DESOXYHEXOSEN UND DEREN VERWENDUNG ZUR HERSTELLUNG VON OLIGOSACCHARIDEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for preparatively, enzymatically producing GDP-6-desoxyhexoses from GDP-D-mannose, mannose-1-phosphate or mannose-6-phosphate in the presence of suitable enzymes, such as a GDP-D-mannose-4,6-dehydratase and optionally a GDP-4-keto-6-desoxy-D-mannose-3,5-epimerase-4-reductase or a GDP-4-keto-6-desoxy-D-mannose-4-reductase. The invention also relates to a method for coupling the resulting GDP-activated hexoses with oligo- or polysaccharides using glycosyl transferases, e.g., fucosyl transferases.

(57) Zusammenfassung

Vefahren zur enzymatischen präparativen Herstellung von GDP-6-Desoxyhexosen aus GDP-D-Mannose, Mannose-1-phosphat oder Mannose-6-phosphat in Gegenwart geeigneter Enzyme wie einer GDP-D-Mannose-4,6-Dehydratase und gegebenenfalls einer GDP-4-Keto-6-desoxy-D-mannose-3,5-epimerase-4-reduktase oder einer GDP-4-Keto-6-desoxy-D-mannose-4-reduktase und Verfahren zur Kopplung der erhaltenen GDP-aktivierten Hexosen mittels Glycosyltransferasen, z.B. Fucosyltransferasen an Oligo- oder Polysacchariden.



Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Guanosindiphosphat-6-desoxyhexosen und deren Verwendung zur Herstellung von Oligosacchariden

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Synthese von Guanosindiphosphat (GDP)-6-desoxyhexosen, beispielsweise GDP-4-Keto-6-desoxy-D-mannose, GDP-L-Fucose und GDP-L-Perosamin, ausgehend von einfachen Nährstoffen bzw. von GDP-D-Mannose. Das Verfahren betrifft weiterhin die Verwendung von in Mikroorganismen bzw. in vitro gebildeten GDP-6-Desoxy-hexosen zur Synthese von Oligo- oder Polysacchariden mittels Glycosyltransferasen.

In der Natur in großer Menge auftretende einfache Hexosen, beispielsweise D-Glucose, D-Glucosamin, D-Mannose und D-Galactose, werden in Oligo- oder Polysaccharide eingebaut, indem sie zunächst mittels Nucleosidtriphosphaten (NTP) zu NDP-Hexosen (UDP-, dTDP-, GDP-, CDP-Hexosen) aktiviert werden und anschließend durch spezifische Glycosyltransferasen auf entsprechende Vorläufermoleküle übertragen werden. Vielfach werden aber diese einfachen Zucker zunächst noch biosynthetisch zu sekundär veränderten NDP-aktivierten Hexosederivaten umgesetzt. Eine große Gruppe dieser Zuckermoleküle, NDP-6-Desoxyhexosen (meist dTDP-, GDP- oder CDP-aktivierte Hexosederivate), ist durch den Verlust der 6-Hydroxylgruppe gekennzeichnet und wird in vielerlei Abwandlungen in viele biologische Moleküle mit charakteristischer Funktion eingebaut. Typische Vertreter dieser Stoffgruppe sind die L-Fucose (aus GDP-D-Mannose), die L-Rhamnose (aus dTDP-D-Glucose) und die 3,6-Didesoxyhexosen der Enterobakterien (z.B. D-Colitose; aus CDP-D-Glucose). Aus GDP-D-Mannose hergestellte Zuckerderivate, wie z.B. L-Fucose und D-Perosamin, werden über zahlreiche Enzyme (ca. 30) hergestellt, die vielfach Endprodukt-gehemmt sind. Einen Vorteil für die Überproduktion in einem Wirtsorganismus stellen dabei solche Enzyme dar, die nur eine schwache oder so gut wie keine Endprodukthemmung zeigen, wie z.B. die ManB (Phosphomannomutase), ManC (Mannose-1-phosphat Guanylyltransferase [GDP-Mannose Pyrophosphorylase oder Synthase]) und

Enzyme aus dem gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* (Stevenson, G. et al., J. Bacteriol. 178(16), 4885-4893, 1996).

Der Biosyntheseweg der 6-Desoxyhexosen startet typischerweise mit einer Dehydratisierungsreaktion katalysiert durch eine NAD(+)-abhängige NDP-Hexose-4,6-Dehydratase, wodurch eine NDP-6-Desoxy-D-4-hexulose entsteht (Abbildung 1; Piepersberg, W., Crit. Rev. Biotechnol. 14, 251-285, 1994; Liu, H.-W. und Thorson, J.S., Ann. Rev. Microbiol. 48, 223-256, 1994; Piepersberg, W. und Distler, J. In: Biotechnology (2nd Ed.), Vol. 7, Products of Secondary Metabolism (Rehm, H.-J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P., Eds.), S. 397-488, 1997). Weitere Modifikationsreaktionen können sich auf der Stufe der D-Konfiguration abspielen und verwenden beispielsweise die 4-Ketoverbindung entweder zur Transaminierung, Dehydroxylierung der benachbarten 3-Hydroxygruppe über eine Dehydrasereaktion oder zur enantioselektiven Reduktion zur 4-Hydroxygruppe. Andere Biosynthesewege wandeln die NDP-6-Desoxy-D-4-hexulose zunächst über eine Epimerasereaktion in eine NDP-6-Desoxy-L-4-hexulose um, wobei meist neben der Position 5 gleichzeitig die Position 3 der Hexose in ihrer Stereospezifität umgekehrt wird (Abbildung 1).

Die direkte Herstellung von Fucose ausgehend von Mannose kann im Stoffwechsel nur in der Nukleotid-aktivierten Form erfolgen. Die biosynthetischen Enzyme sind daher auf eine Aktivierung, d. h. den Nukleotidteil, angewiesen. Die Biosynthese anderer sekundärer, d. h. stark modifizierter Zucker erfolgt ebenfalls in der Nukleotid-aktivierten Form, wie am Beispiel der dTDP-L-Rhamnose gezeigt wurde (DE 195 37 217.4; Verseck, S., Dissertation, Universität Wuppertal, 1997). Dabei stellt dTDP-6-Desoxy-D-xylo-4-hexulose ein Zwischenprodukt des Biosyntheseweges dar. Die enzymatische Synthese und Isolierung dieser Substanz wurde ebenfalls beschrieben (Marumo, K. et al., Eur. J. Biochem. 204, 539 - 545, 1992).

Aus GDP-D-Mannose wird beispielsweise GDP-L-Fucose in zwei bis drei aufeinanderfolgenden enzymatischen Schritten hergestellt, wie von Chang et al. am Beispiel der Schweine-Speicheldrüsen gezeigt wurde (J. Biol. Chem., 263, 1693-1697, 1988) und in Analogie zur Biosynthese der L-Rhamnose und der L-(Dihydro-)Streptose in Bakterien (Marumo, K. et al., Eur. J. Biochem. 204, 539 - 545, 1992; Verseck, S., Dissertation, Wuppertal, 1997) angenommen wurde. Reeves et al. (J. Bacteriol. 178, 4885-4893, 1996) nehmen aufgrund der genetischen Hin-

weise in *Escherichia coli* an, daß die beiden Gene *gmd* (GDP-D-Mannose-4,6-Dehydratase) und *wcaG* (GDP-4-Keto-6-desoxy-D-mannose 3,5-EpimeraseII-4-Ketoreduktase) im Gencluster für die Synthese der Colansäure ausreichen, um die Umsetzung zur GDP-L-Fucose zu bewerkstelligen. Folglich wären im Gegensatz zur Synthese von dTDP-L-Rhamnose aus dTDP-D-Glucose für die GDP-L-Fucose-Synthese aus GDP-D-Mannose zwei anstatt drei Enzyme ausreichend (Marumo, K. et al., Eur. J. Biochem. 5 204, 539 - 545, 1992; Verseck, S., Dissertation, Wuppertal, 1997). Darüber hinaus beschreiben Chang et al. (J. Biol. Chem., 263, 1693-1697, 1988) bereits die Umwandlung von GDP-D-Mannose mittels einer spezifischen Dehydratase in zunächst GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose, die anschließend mittels eines Epimerase- und Ketoreduktase-Aktivität aufweisenden Enzyms zu GDP-L-Fucose umgesetzt wird. Von dem gemeinsamen Zwischenprodukt, GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose, leiten sich darüber hinaus wahrscheinlich andere Desoxyhexosen ab, wie z.B. das Transaminierungsprodukt GDP-D-Perosamin, das auf die Gegenwart des Gens *rfbE* in dem Enterobakterium *Vibrio cholerae* zurückgeführt wird (Manning, P.A. et al., Gene 158, 1-7, 1995). Die direkte Herstellung von L-Fucose, D-Perosamin und anderen Abkömmlingen des GDP-6-Desoxyhexose-Biosyntheseweges ausgehend von D-Mannose ist dagegen in Abwesenheit der spezifischen Nukleotidgruppe nicht in wirtschaftlich interessanten Mengen möglich.

L-Fucose und D-Perosamin sind wichtige Bausteine von extrazellulären Polysacchariden, Glycoproteinen und anderen Zelloberflächen-Glykokonjugate, beispielsweise von Tetrasacchariden, wie Sialyl LewisX. Darüber hinaus sind L-Fucose und D-Perosamin wichtige Bestandteile von anderen Naturstoffen, wie beispielsweise des Macrolid-Antibiotikums Perimycin. Die Übertragung der Zucker aus den GDP-aktivierten Vorstufen in solche (pseudo-)saccharidischen Endprodukte erfolgt in der Regel über spezifische Glycosyltransferasen. Es sind vielerlei Quellen für Fucosyltransferasen, einschließlich humaner Proben bekannt: Fut1 (Flegel W. A., Dissertation Universität Ulm, 1998, Fut2 (Kelly, R.J. et al., J. Biol. Chem. 270 (9), 4640-4649, 1995) oder Fut3 (Cameron, H.S. et al., J. Biol. Chem. 270 (34), 20112-20122, 1995) und verschiedene Bakterien, z.B. aus *Escherichia coli* (Stevenson, G. et al., J. Bacteriol. 178 (16), 4885-4893 (1996)), aus *Yersinia enterocolitica* (Zhang, L. et al., Mol. Microbiol. 23, 63-76, 1997) oder aus *Helicobacter pylori* (Martin, S.L., Glycobiology (im Druck)).

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein einfaches, aus möglichst wenigen Schritten bestehendes Verfahren zur Herstellung von Guanosindiphosphat (GDP)-6-Desoxyhexose-Verbindungen zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung einer GDP-D-hexose, wobei als Ausgangsverbindung GDP-D-Mannose oder eine in GDP-D-Mannose überführbare Verbindung in Gegenwart eines Enzyms oder mehrerer Enzyme, die GDP-D-Mannose-4,6-dehydratase (Gmd, RfbD)- und gegebenenfalls GDP-4-Keto-6-desoxy-D-mannose-3,5-epimerase-4 Reduktase (WcaG)- oder GDP-4-Keto-6-desoxy-D-Mannose-4-Aminotransferase (RfbE)-Aktivität aufweisen, inkubiert und das gewünschte Produkt isoliert wird. Die für die enzymatische Synthese erforderlichen Enzyme werden erfindungsgemäß bevorzugt durch Klonierung der für diese Enzyme kodierenden Gene bzw. kodierende DNA-Fragmente, Insertion in einen oder mehrere Vektor(en) und Transformation in eine bakterielle oder pilzliche Wirtszelle gewonnen. Insbesondere ist das Verfahren zur präparativen in vitro-Gewinnung und Aufreinigung von GDP-4-Keto-6-desoxy-D-Mannose bzw. GDP-L-Fucose durch Überproduktion der entsprechenden Biosyntheseenzyme in geeignete Wirtsorganismen, wie beispielsweise in *E. coli* geeignet. Bei den Biosyntheseenzymen handelt es sich um Phosphomannomutase (ManB), GDP-D-Mannose-Synthase (ManC oder Pyrophosphorylase, Mannose-1-Phosphat-Guanyltransferase), GDP-D-Mannose-4,6-dehydratase (Gmd, RfbD) und/oder GDP-4-Keto-6-desoxy-D-Mannose-3,5-epimerase-4-ketoreduktase (WcaG, oder GDP-L-Fucose-Synthase), die vorzugsweise aus *E. coli* stammen (Stevenson, G. et al., *J. Bacteriol.* 178, 4885-4893, 1996).

Ferner ist das erfindungsgemäße Verfahren zur präparativen Herstellung von GDP-D-Perosamin geeignet, wobei eine Überproduktion der GDP-D-Perosamin-Synthase (RfbE, GDP-4-Keto-6-desoxy-D-Mannose-4-Aminotransferase) aus *Vibrio cholerae* O1 erfolgt.

Demzufolge sind erfindungsgemäß die folgenden Gene bzw. für entsprechende Enzyme kodierende DNA-Fragmente bevorzugt: *manB*, *manC*, *gmd*, *rfbD*, *rfbE* und *wcaG*. Falls erforderlich werden die Gene bzw. entsprechende DNA-Bereiche spezifisch amplifiziert, z.B. durch geeignete Primer in einer PCR-Reaktion, bevor sie zur Expression eingesetzt werden.

Geeignete bakterielle bzw. pilzliche Wirtsorganismen sind beispielsweise *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus carnosus*, *Streptomyces lividans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula polymorpha* und *Pichia stipidis*.

Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist, daß zunächst Mannose-6-phosphat und GTP in Gegenwart von Phosphormannomutase (ManB) und GDP-D-Mannose-Synthase (ManC) inkubiert, GDP-D-Mannose gegebenenfalls separiert sowie zur weiteren Synthase eingesetzt und das gewünschte Folgeprodukt, beispielsweise GDP-L-Fucose, isoliert wird.

Ferner stellt eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens dar, wenn eine sämtliche Ausgangsstoffe bzw. Substrate enthaltene Pufferlösung über ein festes Trägermaterial, an welchem die (Synthese-)Enzyme immobilisiert sind, kontinuierlich perkoliert wird.

Darüber hinaus hat sich erfindungsgemäß als vorteilhaft erwiesen, wenn das Verfahren im Batch-Prozeß bzw. in einem Enzym-Membran-Reaktor kontinuierlich durchgeführt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Kopplung der erfindungsgemäß hergestellten GDP-6-Desoxyhexose an Glykoside, Oligo- oder Polysaccharide in Gegenwart einer Glycosyltransferase-Aktivität aufweisenden Proteins. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur L-Fucosylierung bzw. D-Perosaminylierung durch Glycosyltransfer auf geeignete Substrate und durch Bereitstellung ausreichender Mengen an GDP-aktivierter Hexose, wie beispielsweise GDP-L-Fucose. Der Glycosyltransfer erfolgt bevorzugt enzymatisch und zwar durch Proteine, die Fucosyltransferase- und/oder Perosamintransferase-Aktivität aufweisen.

Die GDP-L-Fucose kann beispielsweise zur enzymatischen Synthese von Oligosacchariden, z. B. von 2-Fucosyl-beta-Galactosiden oder 3-Fucosyl-beta-N-Acetylgalactosaminen, mittels geeigneter Fucosyltransferasen eingesetzt werden; das GDP-D-Perosamin kann ebenfalls zur Glycosylierung geeigneter Rezeptormoleküle wie Oligosaccharide oder Sekundärmetabolite (z.B. Makrolide wie z.B. Perimycin) mittels geeigneter Glycosyltransferasen, z.B. die Perosaminyltransferase aus *Vibrio cholerae* O1 bzw. anderer gram-negativen oder gram-positiven Bakterien, verwendet werden.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung neben einem Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Enzymen zur Biosynthese und Übertragung (Glycosyltransferasen) von GDP-Hexosen, ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Guanosindiphosphat-D-Mannose, Guanosindiphosphat-6-desoxy-D-hexulosen (z.B. GDP-4-Keto-6-desoxy-D-mannose), Guanosindiphosphat-6-desoxy-L-hexosen (z.B. GDP-L-Fucose) und Guanosindiphosphat-4,6-didesoxy-D-hexosamine (z.B. GDP-D-Perosamin). Die Erfindung ist insbesondere mit dem Vorteil verbunden, daß durch bisher nicht in größeren Mengen herstellbare GDP-aktivierte Zucker nunmehr in präparativem Maßstab zugänglich sind und daß darüber hinaus die gewonnenen Bausteine zur in-vitro- oder in-vivo-Synthese von wertvollen Wirkstoffen weiterverwendet werden können. Das Verfahren ist gekennzeichnet durch Isolierung von geeigneten Genen aus Bakterien und deren gentechnischen Einbau in neue Empfängerorganismen, bevorzugt unter Kontrolle geeigneter Kontrollelemente (z.B. Promotoren) zur stärkeren oder steuerbaren Expression der Genprodukte, oder in neue Stoffwechselbeziehungen mit anderen Genen, um so für die genannten Zwecke und Nutzungsmöglichkeiten verwertbar zu werden.

Legenden zu den Abbildungen

- Abbildung 1: Enzymatische Synthese von GDP- β -L-Fucose und GDP-D-Perosamin
- Abbildung 2: Rekombinantes Plasmid pCAW20.1
- Abbildung 3: Rekombinantes Plasmid pCAW19.1
- Abbildung 4: Rekombinantes Plasmid pCAW21.1
- Abbildung 5: Rekombinantes Plasmid pCAW22.1
- Abbildung 6: Rekombinantes Plasmid pCAW13.1
- Abbildung 7: Rekombinantes Plasmid pCAW14.1
- Abbildung 8: Rekombinantes Plasmid pCAW21.2
- Abbildung 9: Rekombinantes Plasmid pCAW22.2

Im folgenden wird das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung anhand von Beispielen näher beschrieben.

Beispiel 1

Anzucht von *E. coli*-Stämmen, Präparation der Plasmid-DNA und Isolierung von DNA-Fragmenten

E. coli DH5 α und *E. coli* BL21(DE3) wurden vorzugsweise in LB-Medium (Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, Natriumchlorid 5 g/l) bei 37 °C bebrütet. Plasmid-tragende Bakterien wurden unter Selektionsdruck von Antibiotika gehalten (Ampicillin 100 μ l/ml; Chloramphenicol 30 μ l/ml). Die Kultivierung erfolgte auf einem Rundschüttler bei 270 rpm. Als Übernachtskultur wurden Ansätze bezeichnet, die mindestens 12 h bebrütet wurden.

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden die Zellen aus einer 1,5 ml Übernachtskultur, unter Selektionsdruck bebrütet, eingesetzt. Die Isolierung der Plasmide erfolgte nach der Methode der alkalischen SDS-Lyse (Birboim, H.C., Doly, J., Nucleic Acid Res. 7, 1513, 1979).

Zur Hydrolyse von Vektor-DNA wurden ausschließlich Restriktionsendonukleasen nach Vorschrift des Herstellers (Gibco BRL, Eggenstein) eingesetzt. Zur Restriktion von 10 μ g Plasmid-DNA wurden 5 U (Unis) der jeweiligen Restriktionsendonuklease eingesetzt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Um eine vollständige Hydrolyse zu gewährleisten wurde die gleiche Menge Restriktionsendonuklease ein zweites Mal zugegeben und wiederum wenigstens für 1 h inkubiert.

Die gespaltene DNA wurde mit Hilfe eines 1%igen horizontalen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Zur Elution wurden die Gelstücke, welche die DNA-Fragmente enthielten, mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der DNA-Fragmente aus der Agarose erfolgte nach Vorschrift mit dem JETsorb-Kit (Genomed, Bad Oeynhausen).

Beispiel 2

Isolierung von chromosomaler DNA (modifiziert, Pospiech, A., Neumann, B., TIG 11, 217-218, 1995)

Für *E. coli* DH5 α -Zellen wurde eine 1,5 ml UN-Kultur bei 37 °C in LB-Medium angezogen und durch Zentrifugation (5 min, 7000 rpm) geerntet. Das Zellsediment wurde in 567 μ l TE-Puffer resuspendiert und zusammen mit 30 μ l SDS (10%), 20 μ l Lysozym-Lösung (20 mg/ml) und 3 μ l

Proteinase K (20 mg/ml) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 100 µl 5 M Natriumchlorid-Lösung und 80 µl CTAB-Lösung (Hexadecyltrimethylammonium-bromid) zugegeben und mehrfach invertiert und bei 65°C für 10 min inkubiert. Nach der Zugabe von 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol wurde 5 min zentrifugiert (3000 rpm) und die wässrige Phase in einem neuen Gefäß mit dem selben Volumen Phenol/Chloroform vermischt. Durch Zentrifugation wurden die Phasen erneut getrennt und die wässrige Phase mit 0,6 Volumenteilen 2-Propanol zusammengegeben und die gefällte DNA abzentrifugiert. Die DNA wurde einmal mit 1 ml Ethanol (70%) gewaschen und nach dem Trocknen bei RT in 100 µl TE-Puffer (Tris/HCl pH8 10 mM, EDTA 1 mM) resuspendiert.

Beispiel 3

Polymerase-Ketten-Reaktion

Die PCR dient der spezifischen in-vitro-Vermehrung ausgesuchter DNA-Bereiche.

Für die Reaktionen wurde Vent-DNA-Polymerase nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs, Schwalbach) eingesetzt. Durchgeführt wurde die Reaktion in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen).

Die Amplifikation eines DNA-Abschnittes mittels der PCR-Technik (Polymerase Chain Reaction, Saiki et al., 1985) wurde in einem 100 µl Standardansatz durchgeführt (Tab.1).

Tabelle 1

Zusammensetzung der PCR-Ansätze

	gmd	wcaG	manB	manC	rfbD	rfbE
Polymerase-Puffer (10x)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
dNTP-Mix (1,2 mM)	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl
Primer* (Gen-Start)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Primer* (Gen-Ende)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
DMSO	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Magnesiumsulfat (100 mM)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Vent-Polymerase	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
chromosomale DNA	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Wasser	59 µl	59 µl	59 µl	59 µl	59 µl	59 µl

*Die Primer wurden, bevor sie in die PCR eingesetzt wurden, 1:10 verdünnt. Die Konzentration entsprach im PCR- Ansatz - 50 pmol/100 µl. $OD_{260} = 1,0/100 \mu l = 100 \text{ pmol}$. Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug jeweils 100 µl und wurde mit 60 µl sterilem Mineralöl überschichtet.

Die PCR-Ansätze zur Amplifikation bestimmter DNA-Bereiche wurden den tabellarisch aufgeführten Temperaturprogrammen (Tab. 2) unterzogen.

Tabelle 2

Zusammenfassung der PCR-Programm-Daten

[illegible]

- * Die Temperaturänderung (ramping rate) zwischen den einzelnen Schritten betrug 2 °C/s.
- ** Die Zugabe der Polymerase erfolgte nach einem "hot start" während des ersten 95°C-Schrittes.

Der PCR-Programmverlauf wurde so gewählt das die Schritte 2 - 4 in einem Durchlauf 6 mal, und die Schritte 5 - 7 30 mal wiederholt wurden.

Tabelle 3: Verwendete PCR-Primer

Name	Gen/Anmerkung	Sequenz*
PMANB1	<i>manB</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle	5'GCCTGAAAAAGGGTAACCATATGAAAAA3'
PMANB2	<i>manB</i> , <i>Bam</i> HI-Schnittstelle	5'GGGGTAAGGGAGGATCCGACATTAC3'
PMANC1	<i>manC</i> , <i>NcoI</i> -Schnittstelle	5'TTCGGGGATAACCATGGCGCAGTCG3'
PMANC2	<i>manC</i> , <i>Bam</i> HI-Schnittstelle	5'ACACCGCGGATCCGCATTTCATTGCC3'
CAMD1	<i>gmd</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle	5'ACAGAGGAATAACATATGTCAAAGTCGC3'
CAMD2	<i>gmd</i> , <i>Bgl</i> II-Schnittstelle	5'CCAGCAATAAAAGATCTTTGTTTACTCATGC3'
CAMD3	<i>wcaG</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle	5'ATCGCGCTGGAGTCATACATATGAGTAAAC3'
CAMD4	<i>wcaG</i> , <i>Bgl</i> II-Schnittstelle	5'ACGTAAAAAGATCTTTACCCCCGAAA3'
CAVC1	<i>rfbD</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle	5'GGATATTTACATATGAATAAAAAAGTTG3'
CAVC2	<i>rfbD</i> , <i>Bgl</i> II-Schnittstelle	5'CAGGAATCATTTAAAAGATCTCACTCTAC3'
CAVC3	<i>rfbE</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle	5'GTGAGGTCCTTCATATGATTCTGTAT3'
CAVC4	<i>rfbE</i> , <i>Bam</i> HI-Schnittstelle	5'GGAGGTAAGGGATCCCAAACACTACTA3'

* Neu gebildete Schnittstellen sind in der Tabelle angegeben und in der Nucleotidsequenz unterstrichen.

Beispiel 4

Klonierung der Leserahmen von *manB*, *manC*, *gmd*, *rfbD*, *rfbE* und *wcaG* in Expressionsvektoren

Für die Überexpression von ManB, ManC, Gmd, RfbD, RfbE und WcaG in *E. coli* wurden die durch PCR isolierten Leserahmen in Expressionsvektoren kloniert. In diesem Fall wurden hierfür vorzugsweise die Expressionsvektoren pET11a und pET16b der Firma Novagen (Studier, F.

W., et al., Methods Enzymol. 189, 113-130, 1990) ausgewählt. Bei diesen Vektoren handelt es sich um starke Klonierungs- und Expressionssysteme für rekombinante Proteine in *E. coli*.

Für die Klonierung in die Vektoren wurde diese mit Hilfe der Hydrolyse durch die Restriktionsendonucleasen *NdeI* bzw. *NcoI* und *BamHI* linearisiert. Die mit *NdeI* bzw. *NcoI* und *BglII* bzw. *BamHI* hydrolysierten Fragmente der PCR-Produkte von *manB*, *manC*, *gmd* und *wcaG* wurden in die zuvor *NdeI* bzw. *NcoI* und *BamHI* hydrolysierten Expressionsvektoren liniert (pCAW13.1 (*rfbD*); pCAW14.1 (*rfbE*); pCAW19.1 (*manB*); pCAW20.1 (*manC*); pCAW21.1 (*gmd*); pCAW22.1 (*wcaG*); pCAW21.2 (*his-gmd*); pCAW22.2 (*his-wcaG*), siehe Fig. 2-9) und in *E. coli* transformiert. Durch die Klonierung in die *NdeI* bzw. die *NcoI*-Schnittstelle der pET-Vektoren wurde sichergestellt, daß das Startcodon erhalten bleibt und im optimalen Abstand zur Shine-Dalgarno Sequenz auf dem Vektor liegt.

Der Vektor pET16b ermöglicht durch seine leader Sequenz (*his*) eine Fusion von 12 Histidinresten an den N-Terminus des überexprimierten Proteins, welche eine Voraussetzung für eine Aufreinigung des Proteins über eine Ni-Agarose-Säule waren. Die auf diese Weise entstandenen rekombinanten Proteine werden im Folgenden als His-Gmd bzw. als His-WcaG und die für diese codierenden Gene als *his-gmd* bzw. als *his-wcaG* bezeichnet.

Ligation: Die zu ligierenden Fragmente und Vektoren wurden durch Elutionen (Beispiel 1) aus den Agarosegelen aufgereinigt. Bei Ligationen von DNA-Fragmenten mit überstehenden Enden ("sticky end") wurde das zu ligierende Fragment im vierfachen Überschuß zum geschnittenen Vektor eingesetzt und bei RT mit 1 U T4-DNA-Ligase für 4 h inkubiert.

Transformation bei *E. coli* Zellen: Die kompetenten Zellen (Hanahan, D., J. Mol. Biol. 166, 557-580, 1983) wurden auf Eis aufgetaut und mit 2-20 µl DNA-Lösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 30 min auf Eis wurden die Zellen für 90 s auf 42 °C (Hitzeschock) und danach mindestens 2 min auf Eis gestellt. Zur Regenerierung wurde zu den Zellen 800 µl SOC-Medium (2,0% Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM D-Glucose) zupipettiert und 45 min bei 37 °C inkubiert. Von dieser Zellsuspension wurden 100-1000 µl auf Selektionsagarplatten ausplattiert und ÜN bei 37 °C gelagert.

Beispiel 5

DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung, der isolierten Leserahmen, erfolgte mit rekombinanten pET11a-Plasmiden nach der Methode von Sanger et al. (Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467, 1977). Für die automatisierte Sequenzanalyse mit dem A.L.F. Express Sequenzierer (Pharmacia, Freiburg) wurde die Sequenzreaktion mit Fluorescein markierten "termi"- und "promo"-Primern und dem Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit mit 7-deaza-dGTP entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Amersham, Braunschweig) durchgeführt.

termi-Primer 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGGTG 3'

promo-Primer 5'GAAATAAATACGACTCACTATAGGG 3'

Beispiel 6

Überexpression von ManB, ManC, Gmd, RfbD, RfbE, WcaG, His-Gmd und His-WcaG

Die Genprodukte lassen sich vorzugsweise mit Hilfe eines T7-RNA-Polymerase/Promotor-Systems in *E. coli* BL21 (DE3) überexprimieren (Studier et al., 1990). Dazu wurde hinter dem $\phi 10$ Promotor das entsprechende Gen in die MCS der Vektoren pET16b bzw. pET11a kloniert (s. Beispiel 4), die eine geeignete SD-Sequenz im optimalen Abstand zum Startcodon des Zielgens besitzen. Die entstandenen rekombinanten Plasmide wurden durch Transformation in kompetente Zellen des *E. coli* Stamms BL21 (DE3) eingebracht.

Überexpression in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS: Von einer ÜN-Kultur des Stammes mit entsprechendem Plasmid wurde LB-Medium (mit Ampicillin, Chloramphenicol) auf eine OD_{540nm} von 0,05 angeimpft und im Schüttler bei 37 °C bis zu einer OD_{540nm} von 0,6-0,8 inkubiert. Durch Zugabe von 1,0 mM Isopropylthiogalaktosid (IPTG) wurde die T7-RNA-Polymerase induziert. 90 min nach Zugabe von IPTG wurden die Zellen geerntet.

Für Proteinextrakte aus *E. coli* Überexpressionsklonen wurden die Zellen durch Abzentrifugieren geerntet und zweimal mit Zellaufschlußpuffer gewaschen. Zum Resuspendieren wurden 1,5 ml

Zellaufschlußpuffer auf 1,0 g Zellen gegeben. Zum Aufschließen der Zellen wurden zwei Methoden alternativ verwendet, wobei sich die Wahl danach richtete, wieviel Puffer zum Resuspendieren nötig war. Bei einem Volumen von weniger als 5 ml wurden die Zellen mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen, wobei die Zellen 5 min mit Ultraschall (50 Zyklen, 15 s Pulsen und 15 s Pause) beschallt und gleichzeitig mit einer Eis/Wasser-Mischung gekühlt wurden. Zur Kontrolle der Vollständigkeit des Aufschlusses wurde der Extrakt unter dem Mikroskop überprüft.

Wenn die Zellen in einem Volumen von mehr als 5 ml Aufschlußpuffer resuspendiert wurden, konnten sie zweimal mit 1300 psi durch eine French-Press (American Instrument Company, Maryland, USA) aufgeschlossen werden.

Die Suspensionen mit den aufgeschlossenen Zellen wurden im SS-34 Rotor (Sorvall, DuPont, Bad Nauheim) zwischen 30 - 45 min bei 16000 rpm zentrifugiert, wobei Zellbruchstücke sedimentieren. Die Enzymproteine wurden mit klassischen Methoden der Enzympräparation oder alternativ als His-Tag-Fusionsproteine (s. Beispiel 7) in hochangereicherter Form präpariert und in stabiler Form konserviert.

Tabelle 4

Daten der Gene und der erwarteten Genprodukte

Gen bzw. Genprodukt	Größe des PCR-Produktes	Größe des Gens	Berechnete Proteingröße	Proteingröße im SDS-PAGE
<i>manB</i> /ManB	1412 bp	1371 bp	50430 Da	= 50 kDa
<i>manC</i> /ManC	1486 bp	1437 bp	52996 Da	= 53 kDa
<i>gmd</i> /GmD	1025 bp	1122 bp	42020 Da	= 42 kDa
<i>gmd</i> /His-Gmd			44620 Da	= 45 kDa
<i>rfbD</i> /RfbD	1154 bp	1122 bp	42026 Da	= 42 kDa
<i>rfbE</i> /RfbE	1277 bp	1104 bp	40984 Da	= 40 kDa
<i>wcaG</i> /WcaG	1154 bp	966 bp	36090 Da	= 35 kDa
<i>wcaG</i> /His-WcaG			38690 Da	= 37 kDa

Beispiel 7

Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Die Anreicherung von rekombinanten Proteinen läßt sich vorzugsweise durch eine C- oder N-terminal Fusion, mit Histidin-haltigen Oligopeptiden ermöglichen (Beispiel 4). Mit Hilfe der Ni-NTA-Agarose der Firma Qiagen (Haan) und in Anlehnung an das QIAexpress-Protokoll wurde die Anreicherung durchgeführt. Diese Affinitätschromatographie beruht auf der Bindung der Nickel-Ionen der Ni-NTA-Agarose mit dem His-Tag des speziell konstruierten, rekombinanten Proteins (His-Gmd, His-WcaG). Für die Aufreinigung wurde eine FPLC-Anlage, die aus Liquid Chromatography Controller (LCC-500 Plus, Firma Pharmacia), zwei Kolbenpumpen (P500, Firma Pharmacia), einem Durchfluß UV-Monitor (UV-1, $\lambda_{280\text{nm}}$, Firma Pharmacia), einem 2-Kanal-Schreiber (Rec 482, Firma Pharmacia) und einem Fraktionssammler (Frac 100, Firma Pharmacia) bestand benutzt.

Beispiel 8

Gelelektrophoretische Darstellung von Proteinen

Denaturierende Trennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen und deren Färbung mit dem Coomassie-Farbstoff

Tabelle 5

Zusammensetzung eines Acrylamid/Bisacrylamid-Proteingels

	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (6 %)
Wasser	6,6 ml	5,3 ml
Sammelgelpuffer (1,25M Tris/HCl pH 8,8)	-	2,5 ml
Trenngelpuffer (1,5M Tris/HCl pH 6,8)	5,0 ml	-
10 % (w/v) SDS	210 µl	105 µl
Acrylamid-Bisacrylamid-Lsg. (29 : 1)	8,0 ml	2 ml
Ammoniumpersulfat (50 mg/ml)	210 µl	100 µl
Tetramethylethylendiamin	8 µl	8 µl

Die Elektrophorese erfolgte mit der SERVA Blue-Vertical 100/C Apparatur (BioRad, München) (Gelform, 80 x 100 x 0,75 mm). Die Bestimmung der Proteinkonzentration der zu analysierenden Proben erfolgte mit dem Protein-Assay (BioRad, München), wobei mit BSA eine Eichgerade erstellt wurde. Als Standard für die Molekulargewichte der getrennten Proteine diente der "VIII Dalton-Marker" (14,2 kDa - 66 kDa) von Sigma (Deisenhofen).

Beispiel 9

Bestimmung von Enzym-Aktivitäten

Bestimmung der Phosphomannomutase-Aktivität

Die Bestimmung der Phosphomannomutase-Aktivität erfolgte nach (Verseck, S. et al., Glycobiology 6, 591-597, 1996).

Enzymansatz:

Tris/CHL, pH 8,0	50 mM
MgCl ₂	10 mM
NADP ⁺	1 mM
Glucose-1,6-bisphosphat	0,25 mM
Mannose-1-phosphat	1 mM
Rohextr. ManB	variabel
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	0,5 U/ml
Phosphomannose-Isomerase	0,5 U/ml
Phosphoglucose-Isomerase	0,5 U/ml
Endvolumen	500 µl

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Mannose-1-phosphat gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde, bei 30 °C, durch die Extinktion bei $\lambda_{340\text{nm}}$ spektroskopisch verfolgt.

Bestimmung der-GDP-D-Mannosepyrophosphorylase-Aktivität

Die Bestimmung der GDP-D-Mannosepyrophosphorylase-Aktivität erfolgte mit dem PP_i-Reagenz von Sigma (Deisenhofen).

Enzymansatz:

PP _i -Reagenz	170 µl
Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
MgCl ₂	10 mM
GTP	2 mM
Mannose-1-phosphat	10 mM
Rohextr. ManC	variabel
Endvolumen	500 µl

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Mannose-1-phosphat gestartet. Die Abnahme, bei 37 °C, von NADH wurde spektroskopisch bei $\lambda_{340\text{nm}}$ verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient für NADH₂ betrug $\epsilon_{340} = 6,22 \times 10^6 \text{ l}/(\text{mol} \times \text{cm})$.

Bestimmung der GDP-D-Mannose-4,6-Dehydratase-Aktivität

Die Bestimmung der GDP-D-Mannose-4,6-Dehydratase-Aktivität erfolgte nach (Kornfeld et al., 1965).

Enzymansatz:

Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
GDP-D-Mannose	4 mM
Rohextr. Gmd bzw. RfbD	variabel
Endvolumen	300 ml

Es wurden zu definierten Zeiten 50 µl Probe entnommen, zu 950 µl 1 N NaOH gegeben und weitere 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei $\lambda_{320\text{nm}}$ ($\epsilon_{320} = 4600 \text{ l}/(\text{mol} \times \text{cm})$). In der negativ-Kontrolle wurde GDP-D-Mannose durch Wasser ersetzt.

Bestimmungen der GDP-4-Keto-6-desoxymannose-3,5-Epimerase-4-Reduktase Aktivität

Enzymansatz:

Tris/CHL, pH 7,5	50 mM
GDP-4-Keto-6-desoxymannose	2 mM

- 17 -

NADPH ₂	1 mM
Rohextr. WcaG	variabel
Endvolumen	0,5 ml

Die Reaktionen wurden durch die Zugabe des zu testenden Rohextraktes gestartet. Gemessen wurde die Abnahme von NADPH₂ bei $\lambda_{340\text{nm}}$ ($\epsilon_{340} = 6,22 \times 10^6 \text{ l/mol} \times \text{cm}$), bei einer Temperatur von 37 °C.

Bestimmungen der GDP-D-Perosamin-Synthase Aktivität

Enzymansatz

Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
GDP-4-Keto-6-desoxymannose	2 mM
L-Glutamat	2,5 mM
Pyridoxalphosphat	8 mM
Magnesiumchlorid	1 mM
Rohextr. RfbE	variabel
Endvolumen	0,5 ml

Als Aminodonor wurde die Aminosäure L-Glutamat verwendet.

Der Enzymansatz wurde bei 37 °C inkubiert, und die Reaktion durch Erhitzen auf 100 °C im Wasserbad für 1 min gestoppt. Nach dem Abzentrifugieren des Proteins wurde die Lösung einer HPLC-Analyse unterzogen.

Mit RfbD, RfbE, ManB, ManC, WcaG und Gmd sind die jeweiligen Überexpressionsklone bezeichnet (s. Beispiel 6).

Beispiel 10

Ansatz zur präparativen Umsetzung von D-Mannose-6-phosphat zu GDP-D-Mannose

Ansatz zur präparativen Umsetzung mit ManB und ManC

Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
------------------	-------

- 18 -

Mannose-6-phosphat	150 μ mol
MgCl ₂	10 MM
Rohextr. ManB	120 nat
Rohextr. ManC	120 nat
GTP	150 μ mol
Endvolumen	6 ml

Es wurde Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3) pLysS pCAW19.1 oder pCAW20.1 für die Umsetzung zu GDP-D-Mannose eingesetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Kochen von 1 min abgestoppt. Die Proteine wurden durch Ultrafiltration in Mikrosep-Röhrchen (Ausschlußgröße 3 kDa; Amicon, Heidelberg) bei 8000 rpm (SS-34 Rotor; Sorvall DuPont, Bad Nauheim) über Nacht abgetrennt.

Beispiel 11

Präparative Umsetzung von GDP-D-Mannose zu GDP-4-Keto-6-desoxymannose

Ansatz zur präparativen Umsetzung mit Gmd bzw. RfbD

Tris/HCl, pH 7,5	300 μ mol
<u>GDP-D-Mannose</u>	165 μ mol (100 mg)
Rohextr. Gmd bzw. RfbD	120 nkat
Endvolumen	6 ml

Es wurde Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3) /pLysS pCAW21.1 bzw. 2 oder pCAW13.1 für die Umsetzung von GDP-D-Mannose eingesetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Kochen von 1 min abgestoppt. Die Proteine wurden durch Ultrafiltration in Mikrosep-Röhrchen (Ausschlußgröße 3 kDa; Amicon, Heidelberg) bei 8000 rpm (SS-34 Rotor; Sorvall DuPont, Bad Nauheim) über Nacht abgetrennt. Der Überstand wurde für die präparative Synthese von weiteren GDP-Hexosen wie GDP-L-Fucose oder GDP-D-Perosamin weiterverwendet.

Beispiel 12

Präparative Umsetzung von GDP-4-Keto-6-desoxymannose zu GDP-L-Fucose

Ansatz zur Präparative Umsetzung mit WcaG:

Tris/HCl, pH 7,5	400 µmol
GDP-4-Keto-6-desoxymannose	82 µmol (50 mg)
NADPH ₂	123 µmol
Rohextrakt WcaG	3,5 U
Endvolumen	8 ml

Zur Regenerierung von oxidiertem Nicotinamid-adenindinukleotid-phosphat (NADP⁺) bzw. Nicotinamid-adenindinukleotid (NAD⁺) wird dieses z.B. durch die enzymatische Reaktion mit Isocitrat unter Katalyse von Isocitrat-Dehydrogenase reduziert.

Die GDP-4-Keto-6-desoxymannose stammt aus dem in Beispiel 11 beschriebenen Ansatz. Es wurde für die Umsetzungen Rohextrakte von *E. coli* BL21(DE3) /pLysS pCAW22.1 (WcaG). Diese Ansätze wurden 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde dann auf Eis gekühlt und 150 µl 0,3 M Perchlorsäure dazugegeben. Die so gefällten Proteine wurden bei 30000 g für 1 h abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit 1 M Kaliumhydroxid neutralisiert.

Beispiel 13

Präparative Umsetzung von GDP-4-Keto-6-desoxymannose zu GDP-D-Perosarin

Ansatz zur präparativen Umsetzung mit RfbE:

Tris/HCl, pH 7,5	400 µmol
GDP-4-Keto-6-desoxymannose	82 µmol (50 mg)
L-Glutamat	123 µmol
Rohextrakt RfbE	3,5 U
Pyridoxal-phosphat	100 µmol
Endvolumen	8 ml

Die GDP-4-Keto-6-desoxymannose stammt aus dem in Beispiel 11 beschriebenen Ansatz. Es wurden für die Umsetzungen Rohextrakte von *E. coli* BL21(DE3) /pLysS pCAW14.1 (RfbE) verwendet. Diese Ansätze wurden 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde dann auf Eis gekühlt und 150 µl 0,3 M Perchlorsäure dazugegeben. Die so gefällten Proteine wurden bei 30000 g für 1 h abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit 1 M Kaliumhydroxid neutralisiert.

Beispiel 14

Neben den in den Beispielen 10-13 beschriebenen Enzymreaktionen im Batch-Verfahren wird die Reaktion des weiteren mit immobilisierten Enzymen erreicht, welche von der Substrat- und Pufferlösung, vorzugsweise bei einer Temperatur von 30-37 °C, umspült wird. Eine Immobilisierung der Enzyme wird z.B. durch die Bindung der His-Taq-Fusionsproteine (HisGmd, HisWcaG) an eine Ni-NTA-Agarose Säule (Qiagen, Hilden) oder durch die Verwendung eines Membranreaktors erreicht.

Beispiel 15

Aufreinigung von GDP-Hexosen

DOWEX-Ionen-Austauschchromatographie

Um das Nebenprodukt NADP⁺ bzw. NAD⁺ und das Restsubstrat NADPH₂ bzw. NADH₂ bei der Synthese von GDP-L-Fucose bzw. um Pyridoxal-phosphat, L-Glutamat und α-Ketogutarat bei der Synthese von GDP-D-Perosamin abzutrennen, wurde eine Anionen-Austauschchromatographie mittels eines 1 x 8 DOWEX-Harzes ("mesh" = 200-400; Serva, Heidelberg) mit Formiat als Gegenion gewählt. Das Harz wurde in eine SR 25/50-Säule (Pharmacia, Freiburg) gefüllt. Die Gelbetthöhe betrug 12,5 cm und das Gesamtvolumen 61 ml. Für die Trennung wurde eine FPLC-Anlage (Pharmacia, Freiburg) mit einem UV-Monitor Filter für λ_{254nm} benutzt. Die Elution erfolgte wie folgt:

Elutionsvolumen (ml):	Dowex-Puffer A (%):
1200	50
1400	100

Das Gesamtvolumen betrug 1400 ml und die Flußrate 6 ml/min. Es wurden Fraktionen zu 5 ml aufgefangen. Die Elution erfolgte bei 5 °C. Es folgte eine HPLC-Analyse der Fraktionen, wonach die Fraktionen vereinigt wurden, die die GDP-aktivierte Hexose enthielten. Anschließend wurde diese Lösung im Hochvakuum (Drehschieber-Vakuumpumpe RD4, Vakuubrand GmbH+Co, Wertheim) unter Rühren bei ca. 25 °C auf 10-20 ml eingeeengt. Nach jedem Lauf wurde die Säule mit 185 ml 4 M Ameisensäure regeneriert und solange mit H₂O gespült, bis ein neutraler pH gemessen wurde.

Gelfiltration

Zum Entsalzen der nach der Ionenaustauscherchromatographie erhaltenen Fraktion wurde eine Sephadex G-10-Säule (SR 25/100-Säule; Pharmacia, Freiburg) benutzt. Die Gelbetthöhe betrug 81 cm und das Gesamtvolumen 398 ml. Die Detektion der GDP-aktivierten Hexose erfolgte über einen UV-Monitor (Uvicord SII, I_{254 nm}, Pharmacia, Freiburg) und einem 2-Kanal-Schreiber (Rec 482, Pharmacia, Freiburg). Die Proben wurden mit einem Fraktionssammler (Frac 100, Pharmacia, Freiburg) aufgefangen. Die eingeeengte Fraktion der Anionen-Austauschchromatographie wurde mit einer Peristaltikpumpe (Pump P-1; Pharmacia, Freiburg) und einer Fußrate von 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit H₂O zuerst mit einer Flußrate von 0,5 ml/min für 20-30 ml, danach mit 1 ml/min. Es folgte eine HPLC-Analyse der Fraktionen, wonach die Fraktionen vereinigt wurden, die die GDP-aktivierte Hexose enthielten.

Umsalzung mit einem Anionenaustauschmembran

Um die Reste des Ammoniumformiats gegen NaCl auszutauschen wurde die Fraktion der Gelfiltration mit 10 ml/min auf das Membran-Anionenaustauschmodul Q15 (Sartorius, Göttingen) gepumpt (Pump P-1; Pharmacia, Freiburg). Danach wurde das Anionenaustauschmodul mit 20-50 ml H₂O gespült und anschließend die aktivierte Hexose mit 150 mM NaCl von der Membran eluiert. Die Flußrate betrug 10 ml/min. Anschließend wurde diese Lösung im Hochvakuum (Drehschieber-Vakuumpumpe RD4, Vakuubrand GmbH+Co, Wertheim) unter Rühren bei ca. 25 °C auf 10-20 ml eingeeengt. Nach jedem Lauf wurde die Membran mit 20 - 30 ml 0,2 M NaOH regeneriert und solange mit H₂O gespült, bis ein neutraler pH gemessen wurde.

Gelfiltration und Gefriertrocknung

Das Entsalzen der nach Umsalzen erhaltenen Lösung wurde mit einer Sephadex G-10-Säule wie oben beschrieben durchgeführt.

Nach dem Entsalzen wurde der Pool der GDP-aktivierten Hexose in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei RT gefriergetrocknet (Cryograph LCD-1, Christ GmbH, Osterode am Harz und Drehschieber-Vakuumpumpe RD4, Vakuubrand GmbH+Co, Wertheim).

Beispiel 16

Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Zur Reaktionskontrolle und zur Analyse der Nukleotid-aktivierter Zucker wurde die Hochdruckflüssigchromatographie eingesetzt. Die HPLC-Trennungen wurden durchgeführt mit einem Gerät der Firma Beckmann (Beckmann Instruments, München), bestehend aus UV-Detektor 166, Pumpmodul 125 und Autosampler 502. Folgendes Trennsystem (Payne, S.M. und Ames, B.N., Anal.Biochem. 123, 151-161, 1982) wurden verwendet:

"reversed" phase-Chromatographie:

Säule: Eurospher 100 C18; Korngröße 5 mm; 250 x 4,6 mm (Knauer, Berlin)

Laufmittel A:	Kaliumphosphatpuffer, pH 6	30 mM
	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat	5 mM
	Acetonitril	2%
Laufmittel B:	Acetonitril	100%

Elutionsprogramm:

Flußrate:	1,5 ml/min
von 0% bis 40% Laufmittel B:	60 min
100% Laufmittel A:	15 min

Sämtliche Laufmittel wurden vor der Benutzung in einer Sterilfilter-Einheit mit einer MF12-Membran (Durchmesser 0,2 µm; Schleicher & Schüll, Dassel) filtriert und entgast. In allen Chromatographien besaß die Probenschleife ein Volumen von 20 µl. Die Detektion fand bei 260 nm

statt. Die Auswertung der Elutionsprofile erfolgte mit dem Computerprogramm Gold Version 7.11U (Beckmann Instruments, München). Die Identifizierung der Nukleotid-aktivierten Zucker erfolgte durch Cochromatographie, sowie durch den Vergleich der Retentionszeiten mit Standardsubstanzen. Für die Quantifizierung der Zucker wurde mit Standardsubstanzen eine Dreipunkteichung der Peakflächen in Abhängigkeit von der Konzentration vorgenommen.

Tabelle 6

Retentionszeiten der UV-aktiven Substanzen. .

Probe	Retentionszeiten
GDP-D-Mannose	15,1 min
GDP-D-4-keto-6-desoxy-Mannose	21,6 min
GDP-beta-L-Fucose	19,2 min
GDP-D-Perosamin	5,5 min
GDP	22,7 min
GMP	9,7 min
NADP ⁺	25,6 min
NADPH ₂	39,6 min
Pyridoxal-phosphat	47,9 min

Beispiel 17

NMR-Spektroskopie

Die Identifizierung der GDP-aktivierten Zucker erfolgte durch NMR-Spektroskopie. Die Aufnahmen der ¹H-, ¹³C- und ³¹P-Spektren erfolgte an einem 400 MHz-Gerät (Bruker AC 400, Fa. Bruker-Franzen Analytik, Bremen). Die zu messenden Proben wurden in D₂O gelöst. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Als Referenz standen für GDP-β-L-Fucose die ¹H-NMR Daten von Bis(triethylammonium)-β-L-Fucopyranosyl-Guanosin-5'-Pyrophosphat aus der chemischen Synthese zur Verfügung (Schmidt, R. et al., Liebigs Ann. Chem., 121-124, 1991).

Beispiel 18

In-vivo-Produktion von GDP-Hexosen bzw. von fucosylierten oder perosaminylierten Oligosacchariden

Klonierte Gene (siehe Beispiel 4) werden in Vektoren unter Kontrolle konstitutiver oder induzierbarer Promotoren in einer gemeinsamen Transkriptionseinheit kloniert und in Mikroorganismen, bevorzugt *E. coli*, *Streptomyces sp.* oder *Saccharomyces cerevisiae* transformiert. Bevorzugt werden die Gene unter Kontrolle von Promotoren mit geringerer Expressionsleistung, wie z.B. *lacP* kloniert, um eine gleichbleibend optimale Synthese der Enzyme in einer Fermentkultur oder einem Reaktor mit immobilisierten Zellen zu gewährleisten. Alternativ werden dazu auch die natürlichen Gene mit ihren eigenen Promotoren verwendet. Die aktivierten Zucker werden intrazellulär mit Hilfe geeigneter Glycosyltransferasen z.B. WcbH (Galactosid-2-L-Fucosyltransferase) aus *Yersinia enterocolitica* oder aus *Escherichia coli* (RffT) auf geeignete Substrate z.B. β -Galactoside übertragen, die entweder biosynthetisch in der Wirtszelle hergestellt oder von außen zugesetzt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur enzymatischen Herstellung einer Guanosindiphosphat (GDP)-6-Desoxyhexose, dadurch gekennzeichnet, daß GDP-D-Mannose oder eine diesbezügliche Vorstufe in Gegenwart eines oder mehrere Enzyme(s), welche(s) GDP-D-Mannose-4,6-dehydratase (Gmd, RfbD)- Aktivität und gegebenenfalls GDP-4-Keto-6-desoxy-D-mannose-3,5-epimerase-4-Reduktase- (WcaG) oder GDP-4-Keto-6-desoxy-D-mannose-4-Aminotransferase (RfbE) -Aktivität aufweisen, inkubiert und das gewünschte Produkt isoliert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß GDP-4-Keto-6-desoxy-D-mannose, GDP-L-Fucose oder GDP-L-Perosamin aus GDP-D-Mannose hergestellt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die für die enzymatische Synthese erforderlichen Enzyme durch Klonierung der für diese Enzyme kodierenden Gene bzw. kodierenden DNA-Fragmente, Insertion in einen oder mehrere Vektor(en) und Transformation in eine bakterielle oder ein pilzliche Wirtszelle erhältlich sind.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene bzw. entsprechende DNA-Bereiche zunächst amplifiziert werden.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Genen bzw. DNA-Fragmenten um manB, manC, gmd, rfbD, rfbE und/oder wcaG handelt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Wirtszelle um E.coli, Bacillus subtilis, Corynebacterium sp., Staphylococcus carnosus, Streptomyces lividans, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccaramyces pombe, Hansenula polymorpha, Pichia stipidis handelt.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Mannose-6-phosphat und GTP in Gegenwart von Phosphomannomutase (ManB) und GDP-D-Mannose-Synthase (ManC) inkubiert und GDP-D-Mannose bzw. ein diesbezügliches Folgeprodukt isoliert wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren als Batch-Verfahren durchgeführt wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren in einem Enzym-Membran-Reaktor kontinuierlich durchgeführt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß eine die Substrate bzw. sonstige Ausgangsstoffe enthaltene Pufferlösung über ein festes Trägermaterial, an welchem die Enzyme immobilisiert sind, kontinuierlich perkoliert wird.
11. Verwendung einer nach einem der Ansprüche 1 bis 10 hergestellten GDP-6-Desxoyhexose zur Kopplung an Glykoside, Oligo- oder Polysaccharide.
12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei die Kopplung in Gegenwart eines Glycosyltransferase-Aktivität aufweisenden Proteins erfolgt.
13. Verfahren zur Herstellung von Fucose bzw. Perosamin haltigen Oligo- oder Polysacchariden, dadurch gekennzeichnet, daß eine GDP-aktivierte Hexose mittels eines Proteins, welches Fucosyltransferase- oder Perosamintransferase-Aktivität aufweist, auf ein Oligo- bzw. Polysaccharid übertragen wird.

Abb. 1

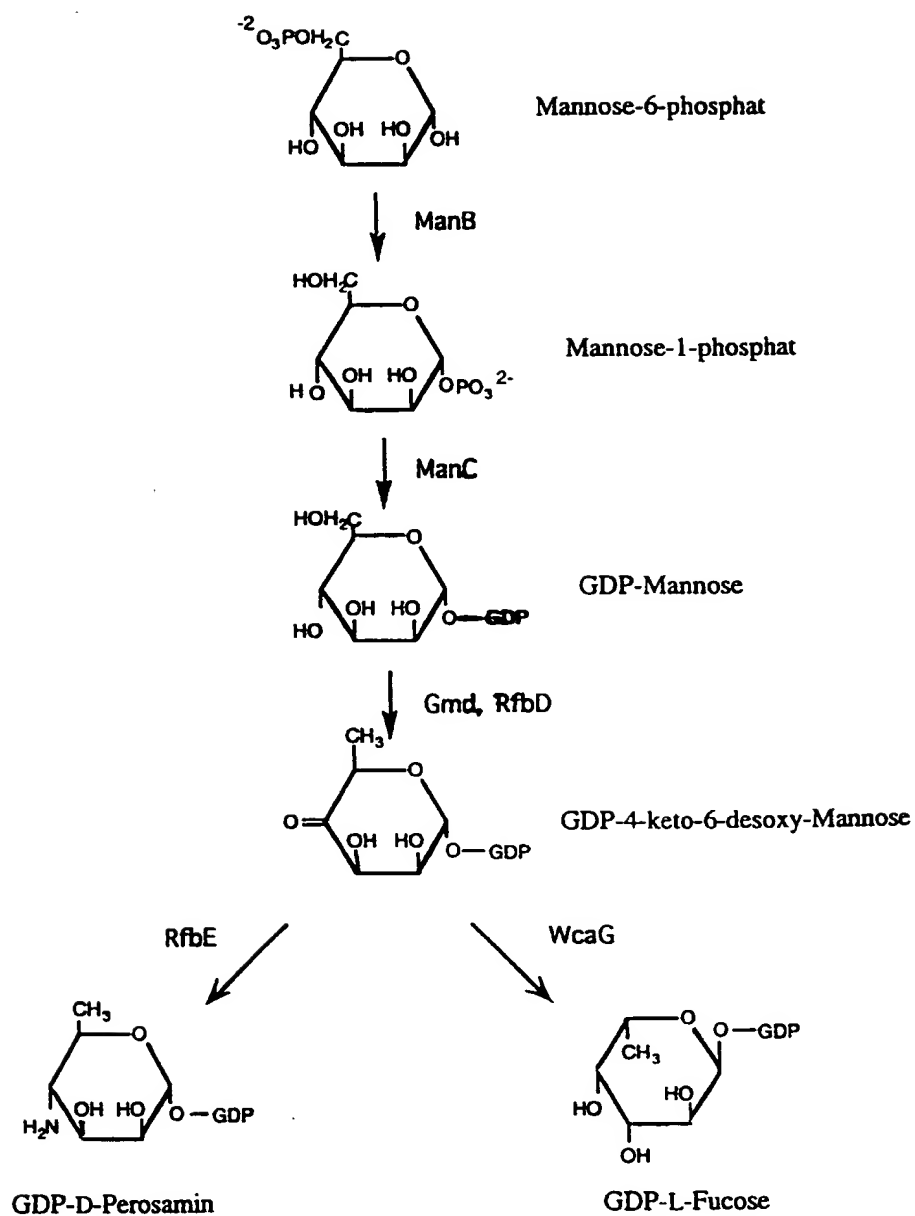


Abb. 2

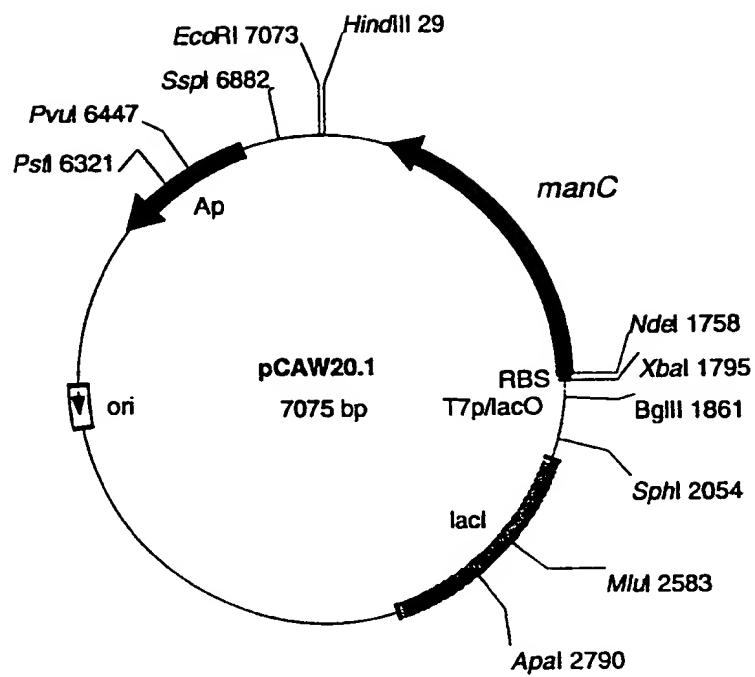


Abb. 3

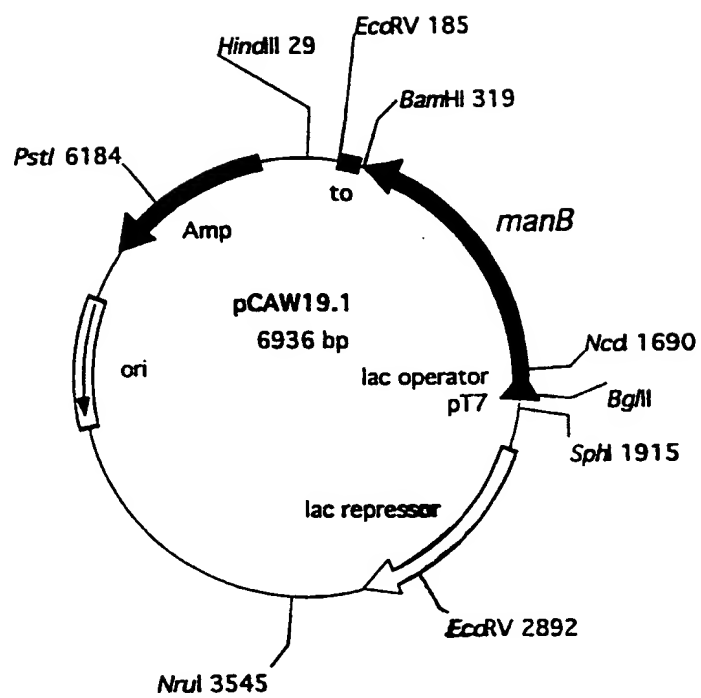


Abb. 4

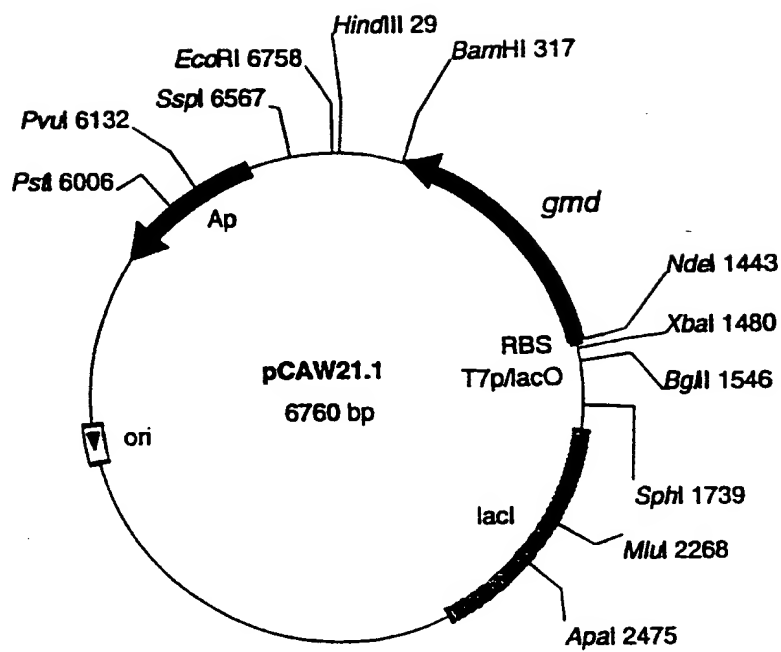


Abb. 5

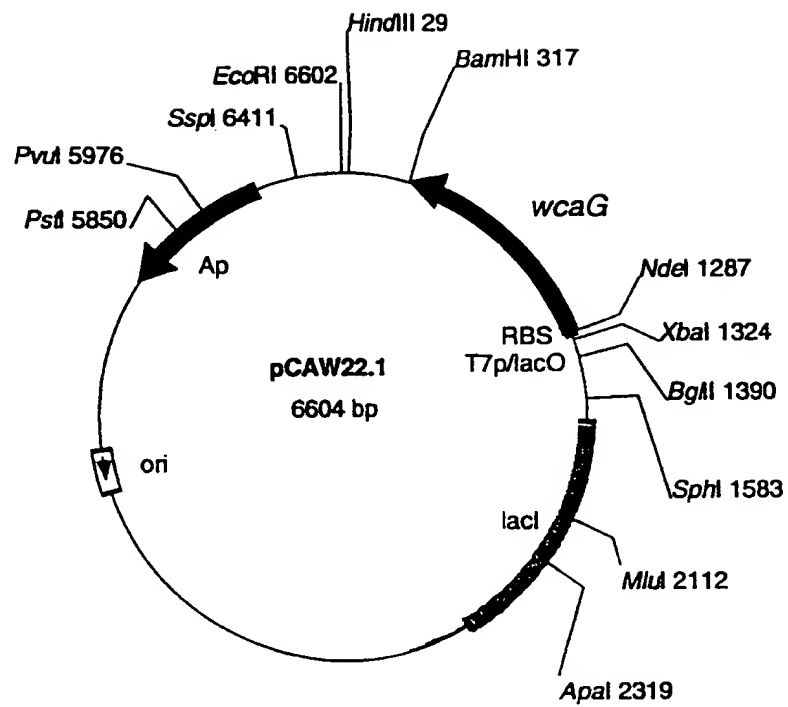


Abb. 6

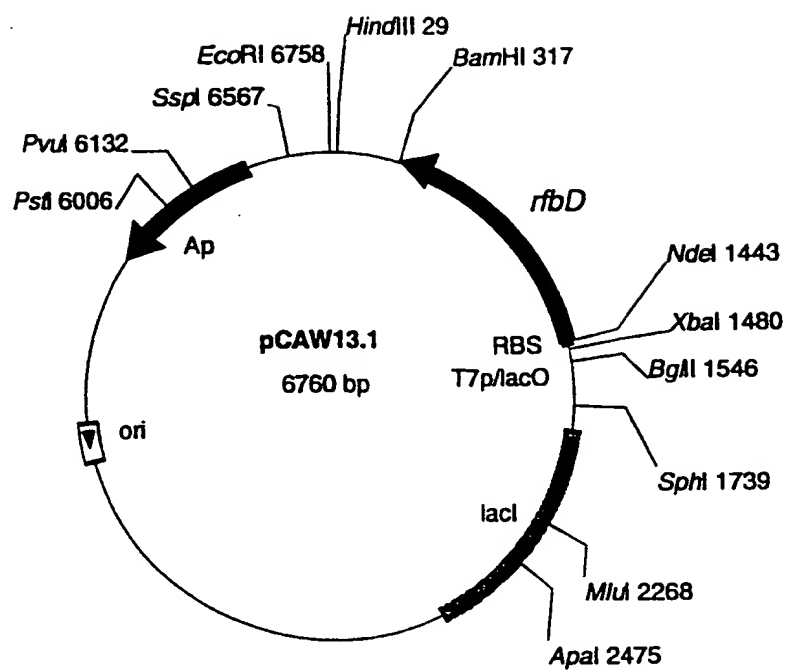


Abb. 7

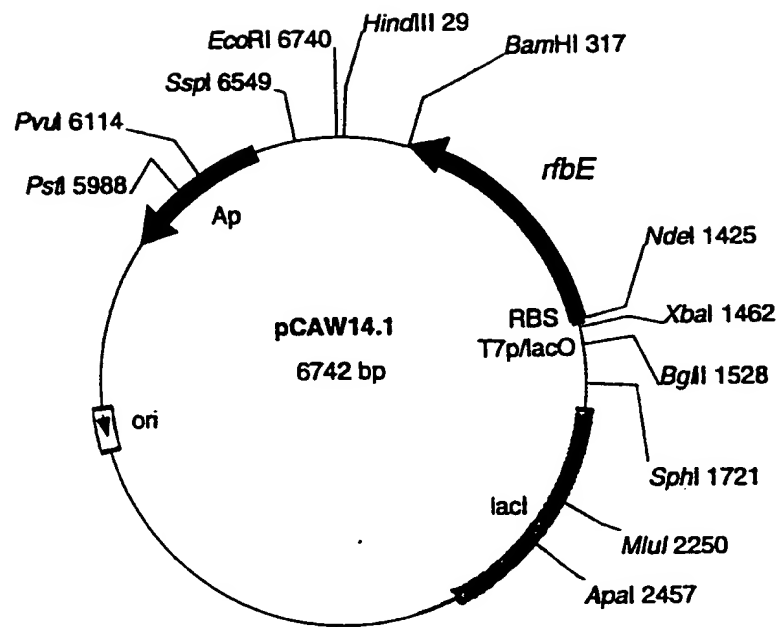


Abb. 8

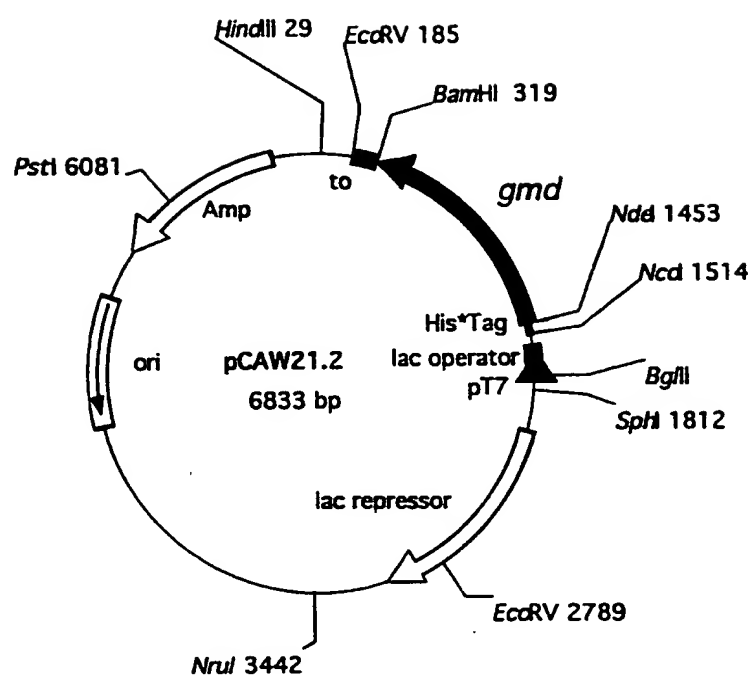


Abb. 9

